

Neurologisches Labor

Redaktion: F. Deisenhammer

Konsensusprotokoll zur Standardisierung von Entnahme und Biobanking des Liquor cerebrospinalis¹⁾

A consensus protocol for the standardisation of cerebrospinal fluid collection and biobanking

Charlotte E. Teunissen^{1,*}, Axel Petzold², Jeffrey L. Bennett³, Frode S. Berven⁴, Lou Brundin⁵, Manuel Comabella⁶, Diego Franciotta⁷, Jette L. Federiksen⁸, John O. Fleming⁹, Roberto Furlan¹⁰, Rogier Q. Hintzen¹¹, Steve G. Hughes¹², Michael H. Johnson¹³, Eva Krasulova¹⁴, Jens Kuhle¹⁵, Maria-Chiara Magnone¹⁶, Cecilia Rajda¹⁷, Konrad Rejdak¹⁸, Holly K. Schmidt¹⁹, Vincent van Pesch²⁰, Emmanuelle Waubant²¹, Christian Wolf²², Gavin Giovannoni²³, Florian Deisenhammer²⁴, Harald Hegen²⁴, Bernhard Hemmer²⁵ und Hayrettin T. Tumani²⁶

¹ Department of Molecular Cell Biology and Immunology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

² Department of Neuroimmunology, Institute of Neurology, UCL, London, UK

³ Departments of Neurology and Ophthalmology, University of Colorado Denver, Denver, CO, USA

⁴ Institute of Medicine, University of Bergen, Bergen, Norway

⁵ Division of Neurology, Department of Clinical Neuroscience, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

⁶ Neurology, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, CEM-Cat, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁷ Laboratory of Neuroimmunology, IRCCS, "C. Mondino Neurological Institute", Pavia, Italy

⁸ Department of Neurology, Glostrup Hospital, University of Copenhagen, Glostrup, Denmark

⁹ Department of Neurology, University of Wisconsin, Madison, WI, USA

¹⁰ Neuroimmunology Unit, Institute of Experimental Neurology, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

¹¹ Department of Neurology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands

¹² Medical Research, Biogen Idec, Maidenhead, UK

¹³ Department of Neurology, Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, Leeds, UK

¹⁴ Department of Neurology, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

¹⁵ Departments of Neurology and Clinical Neuroimmunology, University Hospital, University of Basel, Basel, Switzerland

¹⁶ Clinical Research and Exploratory Development, F. Hoffmann- La Roche Pharma, Basel, Switzerland

¹⁷ Department of Neurology, University of Szeged, Szeged, Hungary

¹⁸ Department of Neurology, Medical University of Lublin, Lublin, Poland/Experimental Pharmacology, Medical Research Center, Warsaw, Poland

¹⁹ Accelerated Cure Project for Multiple Sclerosis, Waltham, MA, USA

²⁰ Department of Neurology, UCL, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

²¹ Department of Neurology, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA

²² Department of Clinical Development, UCB Pharma S.A., Braine l'Alleud, Belgium

²³ Neuroimmunology Unit, Neuroscience Centre, Institute of Cell and Molecular Science Barts and The London Queen Mary's School of Medicine and Dentistry London, London, UK

²⁴ Department of Clinical Neurology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

²⁵ Department of Neurology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität, Munich, Germany

²⁶ Department of Neurology, University Hospital of Ulm, Ulm, Germany

¹⁾Der Artikel ist eine Übersetzung aus dem Englischen des Artikels A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking von Teunissen et al., Neurology; 2009; 73:1914–1922 mit freundlicher Genehmigung.

*Korrespondenz: Dr. Charlotte E. Teunissen, Molecular Cell Biology and Immunology, VU University Medical Center, FdG, P.O. Box 7057, 1007 MB Amsterdam, The Netherlands
Tel.: +31-20-4448061
Fax: +31-20-4448081
E-Mail: c.teunissen@vumc.nl

Zusammenfassung

Die Erforschung von Biomarkern in Körperflüssigkeiten bei neurodegenerativen und neuroinflammatorischen Erkrankungen blickt auf eine langjährige Geschichte zurück. Dennoch

werden nur wenige Liquor cerebrospinalis (Liquor)-Biomarker in der klinischen Praxis verwendet. Einer der problematischen Faktoren in der Liquorbiomarker-Forschung ist die eingeschränkte Aussagekraft von Studien aufgrund einer nicht ausreichend großer Anzahl von Proben, die in Studien von einzelnen Zentren akquiriert werden können. Deshalb ist die Kooperation zwischen mehreren Zentren erforderlich, um große Biobanken von definierten Proben zu etablieren. Standardisierte Protokolle für Biobanking sind unumgänglich, um die durch die größere Anzahl von Liquorproben gewonnene statistische Aussagekraft sicherzustellen und nicht durch mangelhafte Präanalytik einzuschränken. Hier wird ein Konsensusbericht über Leitlinien zu Liquorentnahme und Biobanking durch das BioMS-eu Netzwerk für Liquorbiomarker-Forschung in Multipler Sklerose präsentiert. Schwerpunkte des Berichts sind Liquorentnahme, präanalytische Faktoren und klinische sowie sonstige Informationen. Biobanking-Protokolle sind für Liquor-Biobanken im Rahmen der Erforschung jeder neurologischen Krankheit anwendbar.

Schlüsselwörter: Biobanking; Biomarker; Liquor cerebrospinalis; Konsensus; Standardisierung.

Abstract

There is a long history of research on body fluid biomarkers in neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. However, only very few biomarkers in cerebrospinal fluid (CSF) are being used in clinical practice. One of the most critical factors in CSF biomarker research is the inadequate powering of studies owing to the lack of sufficient samples that can be obtained in single-centre studies. Therefore, collaboration between investigators is needed to establish large biobanks of well-defined samples. Standardised protocols for biobanking are a prerequisite to ensure that the statistical power gained by increasing the numbers of CSF samples is not compromised by preanalytical factors. Here, a consensus report on guidelines of CSF collection and biobanking is presented, formed by the European network for Biomarkers in MS for CSF biomarker research in multiple sclerosis. In this paper, we focus on CSF collection procedures, preanalytical factors, and high quality clinical and paraclinical information. The biobanking protocols are applicable for CSF biobanks for research targeting any neurological disease.

Keywords: biobanking; biomarkers; cerebrospinal fluid; consensus; standardisation.

Einleitung

Die Erforschung von Biomarkern in Körperflüssigkeiten bei neurodegenerativen und neuroinflammatorischen Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose (MS), blickt auf eine langjährige Geschichte zurück. Die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis (Liquor) stellt ein diagnostisches Standardverfahren bei vielen neurologischen Erkrankungen dar [1].

Obwohl die Entnahme von Liquor eine größere Invasivität als jene von Blut oder Urin erfordert, weist sie dennoch große Vorteile in der Erforschung neurologischer Erkrankungen auf. Wegen der unmittelbaren Nähe des Liquors zum Zentralnervensystem (ZNS) und dem Fehlen einer suffizienten Barriere zwischen diesen beiden Kompartimenten kann der Liquor pathologische Veränderungen des Gehirns, des Rückenmarks und der Meningen besser widerspiegeln und folglich können Liquorbiomarker wichtige und spezifische Auskünfte über pathologische Prozesse geben. Das ergänzt jene Informationen, die durch etablierte bildgebende Verfahren des Gehirns gewonnen werden, welche keine Unterscheidung zwischen den pathologischen Kernmerkmalen von MS wie Demyelinisierung, Entzündung, axonale Degeneration und Gliose erlauben.

Gegenwärtig stellt der Nachweis von oligoklonalen IgG Banden und/oder quantitativer intrathekalen IgG-Synthese den am häufigsten verwendeten Biomarker bei MS dar. Trotz umfangreicher Forschungsbemühungen sind keine weiteren Marker identifiziert worden, die in der klinischen Praxis bei MS verwendet werden könnten. Übersichten zum Stand der Wissenschaft der Biomarkerforschung in MS haben aufgezeigt, dass es der Mehrheit von Studien aus verschiedenen Gründen an Aussagekraft mangelt [2, 3]. Eines der größten Probleme ist, dass von einem einzelnen Forschungszentrum keine ausreichend große Anzahl von Liquorproben akquiriert werden kann. Deshalb ist die Kooperation zwischen mehreren Zentren erforderlich, um große Biobanken von definierten Proben zu etablieren.

Warum ist eine Standardisierung von Liquorkollektionsprotokollen notwendig?

Standardisierte Liquorkollektionsprotokolle sollten etabliert werden, um sicherzustellen, dass die durch eine große Anzahl von Proben gewonnene statistische Aussagekraft nicht durch Fehler in der Präanalytik beeinträchtigt wird. Zudem wird die Standardisierung dieser Protokolle und einheitliches Biobanking die Einbeziehung von neuen Zentren erleichtern und es ermöglichen, Studien mit Proben, die den anfänglichen Pilotdaten entsprechen, zu wiederholen. Die Etablierung von Ethikprotokollen, die multizentrische Studien erlauben und die Einrichtung von ständigen Komitees für die Bewertung von Forschungsvorschlägen stellen Vorbedingungen dar, die vor der Gründung eines Netzwerkes von Biobanken erfüllt sein müssen.

Hier präsentieren wir Protokolle für eine standardisierte Liquorentnahme, Biobanking und den Austausch von Liquorproben. Es handelt sich um ein Konsensusprotokoll, das im Verlauf der Sitzungen des European network for Biomarkers in MS (BioMS-eu), in London im März 2007, erstellt wurde. Eine von BioMS-eu durchgeführte Umfrage zeigt die Unterschiede von Liquorkollektionsprotokollen zwischen Forschungszentren auf. Die wesentlichen Ergebnisse sind in Abbildung 1 und Tabelle 1 zusammengefasst. Wir haben einen Kompromiss zwischen Durchführbarkeit und wissenschaftlichen Überlegungen angestrebt. Die Ergeb-

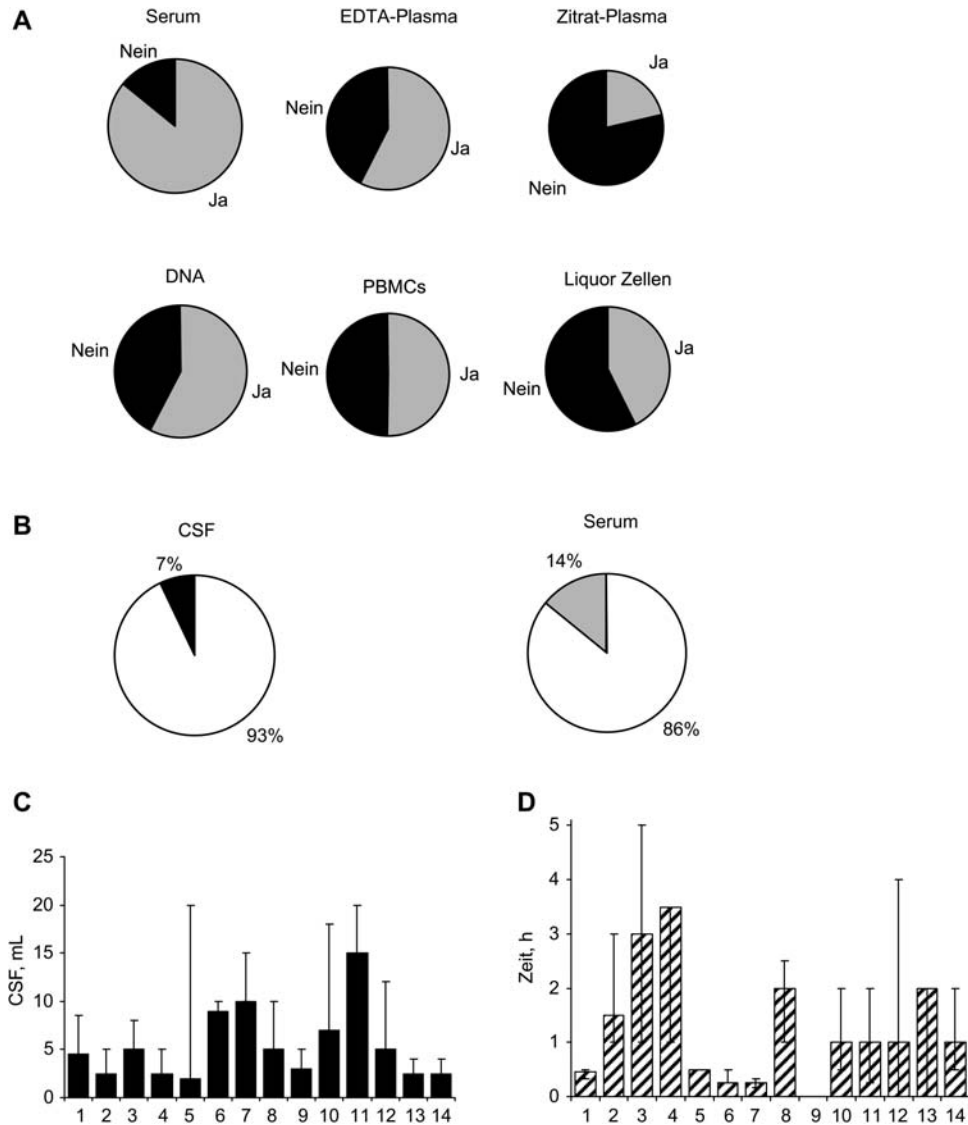


Abbildung 1 Ergebnisse der Auswertung von Entnahmeprotokollen von 14 MS-Biomarker Forschungszentren (2006).

(A) Andere Körperflüssigkeiten, die gleichzeitig mit dem Liquor entnommen werden. Graue Felder: „ja“; schwarz ausgefüllte Felder: „nicht entnommen“. (B) Einlagerungstemperatur von Liquor und Serum. Leere Felder: „-80°C“; schwarz ausgefüllte Felder: „-20°C“; graue Felder: „nicht entnommen“. (C) Durchschnittliches Volumen von Liquor pro Probenentnahme und Patient. Die Balken zeigen die durchschnittlichen Volumina und deren Schwankungsbereich pro Zentrum. (D) Zeitverzögerung zwischen Liquorentnahme, Zentrifugation und Einfrieren. Die Balken zeigen die durchschnittliche Zeitdauer und deren Schwankungsbereich pro Zentrum. CSF, Liquor cerebrospinalis; PBMC, periphere mononukleäre Blutzellen.

nisse sind in Tabellen 2 und 3 dargestellt. Besondere Aufmerksamkeit wurde auf präanalytische Aspekte gerichtet, denn präanalytische Fehler sind für 60% der Gesamtlaborfehler verantwortlich [4], und präanalytische Fehler können sowohl im klinischen als auch im wissenschaftlichen Kontext auftreten. Zusätzlich sind für die optimale Liquorforschung bei MS auch hochwertige klinische und sonstige Informationen, wie Ergebnisse der Magnetresonanztomographie (MRT), erforderlich. Diese Informationen haben eine große Bedeutung für die Einschätzung des prognostischen Wertes eines potentiellen Markers (Tabelle 3).

Wir möchten alle Forscher motivieren, diese Protokolle einzuhalten, um eine optimale Kooperation auf dem Gebiet der MS-assoziierten Liquorbiomarker-Forschung zu erzielen. Die Standardisierung von Liquorkollektionsprotokollen (Tabelle 2) ist wichtig, um technische Artefakte zu vermeiden. Während einige Punkte in der täglichen klinischen Routine nicht möglich sein werden, sind weniger strikte Anforderungen für spezifische Fragenstellungen von bereits validierten Markern ausreichend. So ist etwa für Antikörper-Biomarker-Studien eine Lagerung der Proben bei -80°C nicht notwendig. Daher ist die Dokumentation der nachfol-

Tabelle 1 Ergebnisse der Auswertung von Entnahmeprotokollen von 14 MS Biomarker Forschungszentren (2006).

	Status in europäischen Liquor-Zentren
Prozedur der Liquorentnahme:	
Nadeltyp:	71% atraumatisch, 21% traumatisch, 8% beide Nadeltypen
Tageszeit der Probenentnahme: (entscheidend für Marker, die sensitiv auf circadianen Rhythmus sind)	71% keine bestimmte Tageszeit der Probenentnahme, 29% nur nachmittags
Temperatur bis Einlagerung:	57% Raumtemperatur, 43% bei 4°C
Art des Röhrchens:	50% Sarstedt, 29% Eppendorf, 21% andere
Aliquotierung:	Intervall von 0,2 mL bis 2 mL
Überwachung der Gefrierschränke:	vorhanden in 93% der Zentren
Mehrere Gefrierschränke um die Proben aufzuteilen (back-up):	vorhanden in 14% der Zentren

gend formulierten Punkte von Bedeutung, um das Wiederfinden von Proben, die den Anforderungen bestimmter Studien entsprechen müssen, zu erleichtern. Somit sollten alle Punkte, die in Tabellen 2 und 3 aufgelistet sind, für jede Probe berücksichtigt und dokumentiert werden. Um Missverständnisse zu vermeiden, schlagen wir nicht die Berücksichtigung all dieser Punkte in der täglichen Praxis vor, obwohl viele von ihnen für die richtige Interpretation der Liquor-Routineanalyse erforderlich sind. Wir schlagen vor, die Tabellen 2 und 3 als eine Checkliste für die Liquorbiomarker-Forschung zu verwenden, welche die vorhandene Information zu den spezifischen Punkten übersichtlich darstellt. Die rechte Spalte von Tabelle 2 beinhaltet das, was wir als die „ideale Situation“ einschätzen. Unser Ziel ist, das Bewusstsein für potentielle Einflussfaktoren in Liquorbiomarker-Studien zu erweitern. Wir glauben, dass zukünftige Studien und Berichte über Analysen von Liquorbiomarkern diese Punkte in Betracht ziehen sollten. Forschungsbemühungen, welche die Entdeckung von Biomarkern zum Ziel haben, sollten alle Punkte sorgfältig vor dem Beginn der Studie berücksichtigen.

Idealerweise werden Daten möglichst detailliert gesammelt und in einer leicht zu bedienenden, aber sicheren Datenbank gespeichert. BioMS-eu wird ein Format für eine Datenbank entwickeln, die über die Webseite des Konsortiums öffentlich zugänglich sein wird (www.bioms.eu).

Im Wesentlichen sind die Prozeduren für Entnahme und Einlagerung von Liquor (Tabelle 2) nicht nur speziell für MS, sondern für jede neurologische Krankheit anwendbar.

Prozedur der Liquorentnahme (Tabelle 2)

Punkt 1: Entnahmemenge von mindestens 12 mL

Die entnommene Liquormenge kann die Konzentration von Biomarkern beeinflussen. Die meisten Moleküle und Zellzahlen haben einen von rostral nach kaudal zunehmenden Konzentrationsgradienten [5]. Wird eine kleine Menge entnommen, spiegelt der Liquor die Zusammensetzung im lumbalen Düralsack wider, wohingegen große Volumina den rostral spinalen oder sogar den ventrikulären Liquor repräsentieren. Demzufolge kann der Vergleich der Biomarker-Konzentrationen in der Probe von einer Punktion von 2 mL

mit jener von einer Punktion von 15 mL zu einem fehlerhaften Ergebnis führen. Fehler können auch durch die Verwendung von verschiedenen Portionen für das Biobanking (z.B. initiales und letztes Volumen der Punktion) entstehen. Folglich sollte ein Standardvolumen von Liquor im Zuge der Lumbalpunktion entnommen werden. Die ersten 2 mL können für die Liquor-Basisanalyse (Punkt 33) verwendet werden, der Rest der Probe sollte vor dem Aliquotieren in einem Gefäß gesammelt werden. Ist das nicht möglich, muss die Fraktion, welche für das Biobanking verwendet wird, protokolliert werden. Im Allgemeinen wird ein größeres Volumen von spinaler Flüssigkeit eine größere Zahl von aufeinanderfolgenden Analysen erleichtern. Günstigerweise korreliert die Menge von entnommenem Liquor nicht mit dem Risiko von postpunktionellem Kopfschmerz [6, 7].

Punkt 2: Lokalisation der Punktion: L3–L5

Normalerweise wird diagnostischer Liquor durch eine Lumbalpunktion gewonnen. Aufgrund des steigenden Gradienten der Proteinkonzentration von ventrikulärem zu lumbalen Liquor [5], muss der Ort der Lumbalpunktion dokumentiert werden. Wird Liquor von anderen Lokalisationen wie Zisternen oder von den Seitenventrikeln (z.B. Ventrikeldrainage) entnommen, sollte das ebenfalls dokumentiert werden.

Punkt 3: Entfernung von blutigen Liquorproben

Eine traumatische Punktion, die eine Kontamination des Liquors mit Blut verursacht, tritt bei ca. 14% bis 20% der Lumbalpunktionen auf [8]. Für Marker, die hohe Konzentrationen im Blut aufweisen, wie zum Beispiel Gerinnungsfaktoren, kann eine Kontamination mit Blut zu falsch positiven Resultaten führen. Außerdem führen Blutproteine im Liquor zu supprimierten Proteom-Mustern bei Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry-Time of Flight (MALDI-TOF)-Analysen. Diese Suppression durch Blutproteine ist jedoch nach Entfernung der Blutzellen durch Zentrifugation der Probe vor initialem Einfrieren und nachfolgenden Analysen weniger stark ausgeprägt [9, 10]. Die Dokumentation der Erythrozytenzahl ist essentiell, um die geeigneten Liquorproben für diese Messungen auszuwählen. Liquorproben mit einer Erythrozytenzahl von mehr als 500/µL sollten nicht für Biomarker-Studien verwendet werden.

Tabelle 2 Richtlinien für die Prozedur der Liquorentnahme.

Punkt	Prozedur	Ideale Situation
1	Empfohlenes Volumen:	Mindestens 12 mL. Die ersten 1–2 mL für Basis-Liquor-Untersuchung (siehe Punkt 33), die letzten 10 mL für Biobanking. Aufzeichnung des entnommenen Volumens und der Fraktion, die für Biobanking verwendet wurde.
2	Lokalisation:	L3–L5
3	Blutiger Liquor:	Nicht weiter fortfahren. Kriterien für „blutig“: mehr als 500 Erythrozyten/ μ L. Aufzeichnung der Zahl der Erythrozyten in der diagnostischen Probe.
4	Nadeltyp:	Atraumatisch
5	Art des Röhrchens:	Polypropylen-Röhrchen, Schraubverschluss, Volumen 1–2 mL.
6	Tageszeit der Entnahme und Einlagerung:	Bevorzugt standardisiert innerhalb jedes Zentrums unter Berücksichtigung lokaler Bedingungen. Aufzeichnung von Datum und Uhrzeit der Probenentnahme.
7	Andere Körperflüssigkeiten, die gleichzeitig entnommen werden sollen:	Serum
8	Andere Körperflüssigkeiten, die gleichzeitig entnommen werden sollen:	Plasma: vorzugsweise EDTA, alternativ Citrat.
9	Lagerungstemperatur bis zum Einfrieren:	Raumtemperatur vor, während und nach Zentrifugation.
10	Zentrifugationsbedingungen:	Serum: 2000 g, 10 min bei Raumtemperatur. Liquor: 400 g, 10 min bei Raumtemperatur/2000 g wenn Zellen nicht zu erhalten sind.
11	Zeitverzögerung zwischen Probenentnahme und Zentrifugation und Einfrieren:	Optimal für Liquor: 1–2 Stunden. Optimal für Serum: 30–60 min. Bei Entnahme von beiden Körperflüssigkeiten ergibt sich daher: idealerweise innerhalb einer Stunde. Nach der Zentrifugation müssen die Proben aliquotiert und umgehend bei -80°C eingefroren werden.
12	Art des Röhrchens für Aliquotierung:	Kleine Polypropylen-Röhrchen (1–2 mL) mit Schraubverschluss. Dokumentation des Herstellers.
13	Aliquotierung:	Ein Minimum von zwei Aliquots ist empfohlen. Das empfohlene Probenvolumen von 10 mL für Forschungszwecke sollte für > 10 Aliquots ausreichen.
14	Volumen der Aliquots:	Minimum 0,1 mL. Abhängig vom Gesamtvolumen des Röhrchen: 0,2, 0,5 und 1 mL. Vorzugsweise werden die Röhrchen bis zu 75% des Gesamtvolumens gefüllt.
15	Codierung:	Eindeutige Codes. Gefriertaugliche Beschriftung. Idealerweise Barcodes um die Suche und Verblindung zu erleichtern sowie die Analyse und den Datenschutz der Patienten zu gewährleisten.
16	Gefriertemperatur:	-80°C
17	Zusätzliche Einträge, die im	Lokalisation der Proben.
18	Liquorkollektionsprotokoll	Überwachung der Gefrierschränke.
19	dokumentiert werden müssen:	Aufteilen von Proben auf zwei oder mehr Gefrierschränke.

Punkt 4: Verwendung von atraumatischen Nadeln (Sprotte oder Whitacre)

Es liegt keine Evidenz vor, dass die Art der Nadel für die Lumbalpunktion die Konzentrationen von Biomarkern beeinflusst. Atraumatische Nadeln werden jedoch am besten von den Patienten toleriert und sind mit einem geringeren Risiko für postpunktionellen Kopfschmerz assoziiert, d.h. ca. 12% bei einer Nadelgröße von 20 bis 22 G verglichen mit ca. 70% bei einer Nadelgröße von 16 bis 19 G [11, 12].

Punkt 5: Verwendung von Polypropylen-Röhrchen

Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Art der Liquorröhrchen die Biomarker-Ergebnisse beeinflussen, z.B.

von Gesamt-Tau-Protein und Amyloid-beta [13]. Folglich ist eine Standardisierung wichtig. Wir schlagen für die Sammlung von Liquor die Verwendung von Polypropylen-Röhrchen, die ein geringes Proteinbindungspotential aufweisen, vor. Es sollten keine Zusätze verwendet werden und eine Kontamination kann am besten durch Schraubverschlüsse vermieden werden. Glasröhrchen sollten, nicht zuletzt aus Sicherheitsgründen für das Personal, vermieden werden.

Punkt 6: Tageszeit der Probenentnahme und -einlagerung

Die Dokumentation des Zeitpunktes der Probenentnahme ist bei Biomarkern, die durch den circadianen Rhythmus beein-

Tabelle 3 Richtlinien für erforderliche Informationen in Datenbanken von MS Patienten.

Punkt	Folgende Charakteristika sollten dokumentiert werden
	Basis-demographische Daten
20	• Geburtsdatum (Alter, wenn Geburtsdatum nicht erhebbar)
21	• Geschlecht
22	• Ethnizität
	Outcome-Beurteilung:
	a) Klinische Charakteristika
23	• Klinischer Subtyp zum Zeitpunkt der Probengewinnung entsprechend der McDonald-Kriterien [30].
24	• Datum des Auftretens der Erstsymptome.
25	• Datum der Diagnose entsprechend der McDonald-Kriterien, Datum des ersten und zweiten Schubes.
26	• Datum der Konversion von RRMS zu SPMS (wenn möglich).
27	• EDSS zum Zeitpunkt der Probengewinnung. Wenn möglich: MSFC und andere validierte funktionelle Outcome-Erhebungen zum Zeitpunkt der Probengewinnung.
28	• EDSS und andere funktionelle Scores (z.B. MSFC) beim Follow-up (d.h. die Patienten sollten nachuntersucht werden), inklusive Datum der Erhebung.
29	• Anzahl und wenn möglich, Datum der Schübe der letzten zwei Jahre vor der Probengewinnung.
	• Zeit zwischen Beginn des letzten Schubes und Probengewinnung.
	• Schub zum Zeitpunkt der Probenentnahme gemäß den Schumacher-Kriterien (≥ 1 Anstieg in EDSS > 24 h nach stabilem Zustand für mindestens 30 Tage) [35].
30	• Anzahl und wenn möglich, Datum und der Schübe in jedem Jahr des Follow-ups.
31	• Steroid-Therapien, zum Zeitpunkt der Probengewinnung und bis vor einem Jahr.
32	• Verwendung anderer Medikamente, zum Zeitpunkt der Probengewinnung und bis vor einem Jahr.
33	• Basis-Liquor-Analyse (Zellzahl, Differenzialzellbild, Erythrozytenzahl, oligoklonale IgG-Banden, Albumin-Quotient, Gesamtprotein (wenn Albumin nicht gemessen) und IgG-Index).
	• Aufzeichnung der Methoden der Routineanalysen.
	b) MRT-Charakteristika:
34	• MRT-Scan von Gehirn und Rückenmarks. Dokumentation des Datums.
35	• Anzahl und Volumina der Gd-anreichernden MRT-Läsionen, T1 and T2 Läsionenvolumina, Atrophie von Gehirn und Rückenmark, wenn vorhanden.
36	• Folge-MRT-Scans, wenn möglich.
	c) Generelle Anforderungen an die Datenbank
37	• Die Daten in der Liquor-Datenbank sollten in Englisch hinterlegt sein und in internationalen Einheiten angegeben werden.

flusst werden, entscheidend [14]. Da es oft schwierig ist, den Zeitpunkt der Probenentnahme in der klinischen Routine zu standardisieren, ist die Dokumentation notwendig, um später die geeignete Probe auszuwählen, damit der Einfluss dieser Variable minimiert wird.

Punkt 7 und 8: Gleichzeitige Entnahme von Serum/Plasma und Liquor

Die Entnahme komplementärer Serum- und/oder Plasma-Proben ist maßgeblich für die Evaluation von Liquorbiomarkern, da die Konzentrationen des Markers im Blut oft die Konzentration im Liquor beeinflusst [1]. Zudem sind Serum-/Plasma-Paare notwendig, um die intrathekale Herkunft eines Biomarkers und dessen Spezifität für das ZNS zu bestimmen. Die Präsenz von potentiellen ZNS-Markern im Serum/Plasma zu bestimmen, kann außerdem beim Monitoring der Biomarker-Konzentrationen im Verlauf hilfreich sein. Vakuumröhrchen, die EDTA (in fester Form) verwenden, sind jenen, die Citrat (als Lösung) verwenden, zu bevorzugen. Da Citrat-Röhrchen ein bestimmtes Volumen Citratlösung enthalten, führt das bei unvollständiger Füllung zu einer artifiziellen Verdünnung der Biomarker-Konzentra-

tion. Abhängig vom Typ des Biomarkers und der Methode der Studie empfehlen wir die Entnahme von Serum und Plasma; für einige Methoden ist Plasma beziehungsweise Serum zu bevorzugen [15]. Serum-/Plasma-Proben dürfen nicht hämolysiert sein.

Die Gewinnung von DNA vergrößert die Möglichkeiten, die Phänotypen und Genotypen eines Individuums zu untersuchen. Ein Protokoll für Aufbewahrung und Handling von DNA findet sich im Anhang.

Punkt 9: Probenlagerung bei Raumtemperatur bis zur Zentrifugation und Aliquotierung

Es liegen keine Daten vor, ob Liquor bei Raumtemperatur oder bei 4°C bis zur Verarbeitung aufbewahrt werden soll. Für Serum/Plasma ist das jedoch ausschlaggebend. Um eine Thrombozytenaktivierung zu verhindern, sollten Serum-/Plasma-Proben bis zur Zentrifugation bei Raumtemperatur aufbewahrt werden [16]. Daher ist im Rahmen der meisten Studien eine Verarbeitung von Serum/Plasma und Liquor, einschließlich des Zeitraums während und nach der Zentrifugation, bei Raumtemperatur geeignet. Wenn RNA von Immunzellen des Liquors zu gewinnen ist, sollte der Liquor

jedoch sofort zentrifugiert und bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden. Bei Unklarheit empfehlen wir explorative Studien, um die Auswirkung von Temperatur auf spezifische Biomarker zu untersuchen, bevor mit einer definitiven Studie begonnen wird.

Punkt 10: Standardisierte Zentrifugationsbedingungen

Sollen fragile Zellen für die Isolierung von RNA erhalten bleiben, schlagen wir die Verwendung eines standardisierten Zentrifugationsprotokolls von 400 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur vor, anderenfalls kann die Zentrifugation bei 2000 g durchgeführt werden. Serum sollte mit 2000 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewonnen werden. Die Standardisierung der Zentrifugationstemperatur und -geschwindigkeit ist wahrscheinlich für einige Biomarker von Bedeutung, obwohl keine Studien diese spezifischen präanalytischen Variablen untersucht haben. Für Plasma und Serum ist allerdings bekannt, dass die Verarbeitungstemperatur für spezifische Biomarker entscheidend ist [17]. Nach der Zentrifugation muss der Überstand umgehend aliquotiert und eingelagert werden.

Punkt 11: Standardisierung der Zeitverzögerung zwischen Entnahme, Zentrifugation und Einfrieren der Probe

Studien über die Auswirkungen von präanalytischen Variablen von MALDI-MS/MS proteomics im Bereich von Proteinen/Peptiden unter 20 kDa zeigten, dass der Zeitraum zwischen der Probenentnahme und der Einlagerung für spezifische Serumproteine oder – peptide ausschlaggebend ist als für Liquor [9, 10]. In Bezug auf Liquor zeigte sich, dass eine Verarbeitung innerhalb von zwei Stunden zu keinen artifiziellen Ergebnissen führt [9, 10]. Im Serum können kleine Unterschiede in der Verarbeitungszeit (~10 bis 30 min) zu unterschiedlichen Proteinspektren führen [15]. Aus praktischen Gründen und im Hinblick auf die Gerinnungsdauer von 30 bis 60 min für Serum empfehlen wir ein Zeitintervall von 1,5 Stunden (± 30 min) für beide Körperflüssigkeiten. Einige Biomarker, wie zum Beispiel Antikörper oder bestimmte Zytokine, sind weniger empfindlich hinsichtlich Entnahme- und Einlagerungsbedingungen. Eine systematische Studie, die präanalytische Faktoren auf Zytokinkonzentrationen von IL-6, IL-6-Rezeptor und IL-10 im Serum untersuchte, zeigte keinen Einfluss von Verzögerungen bis zu einem Tag [18]. Sollen Zellen im Liquor erhalten bleiben, empfiehlt sich eine möglichst rasche Weiterverarbeitung, da die Zellzahlen schnell abnehmen. Für neue Biomarker sollten diese präanalytischen Einflussgrößen evaluiert werden, bevor Validierungsstudien begonnen werden. Generell wird empfohlen, Proben so schnell wie möglich, vorzugsweise innerhalb von 1,5 Stunden, zu verarbeiten, um eine Degradation durch Proteolyse zu verhindern. Jedoch ist in den meisten Zentren die Verarbeitung von Proben aus Körperflüssigkeiten innerhalb von einer Stunde kein Standard. Folglich ist die Dokumentation des Entnahme- und Einla-

gerungszeitpunktes erforderlich, um einheitliche Proben für spezifische Biomarker-Studien auswählen zu können.

Punkt 12: Verwendung von kleinen Polypropylen-Röhrchen für die Aliquotierung

Aus identischen Gründen wie für die Liquorentnahme angeführt (Punkt 5), empfehlen wir für die Aliquotierung und Einlagerung von Proben die Verwendung von Polypropylen-Röhrchen. Zudem sollten Röhrchen mit Schraubverschluss verwendet werden, um einen sicheren Verschluss zu gewährleisten. Volumina von 0,25, 0,5 und 1 mL werden empfohlen.

Punkt 13: Aliquotierung

Einfrier- und Auftauvorgänge können die Konzentrationen von Biomarkern beeinflussen. So kann etwa eine einmaliges Einfrieren von Liquorproben zu einem hoch signifikanten Verlust von Amyloid beta (1–42) führen [19]. Die Konzentrationen von Amyloid beta im Liquor sind nach drei weiteren Auftauvorgängen um weitere 20% abgesunken [20]. Im Gegensatz dazu wurden in einer Proteomic-Studie keine Auswirkungen auf Liquor-Proteom-Profile, erstellt durch MALDI-MS, nach bis zu vier Einfrier-Auftau-Zyklen beobachtet [10]. Gleichermäßen wurden Konzentrationen von mehreren Zytokinen nicht durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen beeinflusst [21].

Generell sollte wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben vermieden werden, da Daten nur für wenige Biomarker vorliegen und die Reaktion auf Einfrier-Auftau-Zyklen von neuen Biomarkern nicht bekannt ist. Folglich erweist sich das Aufteilen von Proben in mehrere kleine Aliquots als optimale Methode, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu verhindern. Für jede Probe sollte die Anzahl der Einfrier-Auftau-Zyklen dokumentiert werden. Wie bereits bei Punkt 1 erwähnt, muss die gesamte Liquorprobe vor dem Aliquotieren gepoolt werden, um einen Konzentrationsgradienten zu verhindern.

Punkt 14: Volumina der Aliquots von 0,2, 0,5 und 1 mL

Kleine Volumina der Aliquots sind optimal, um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden und um den Verbrauch von Liquor zu minimieren. Die Röhrchen sollten bis zu 75% aufgefüllt werden, um Gefriertrocknung innerhalb des Röhrchens zu verhindern, welche die Konzentration von Biomarkern beeinflussen würde [22]. Wir empfehlen, die Größe der Röhrchen auf das Volumen der einzulagernden Probe abzustimmen. Der Effekt der Gefriertrocknung sollte nur ein Problem darstellen, wenn der Verschluss nicht luftdicht ist.

Punkt 15: Codierung und Verwendung von gefriertauglichen Beschriftungen

Eindeutige Codes sind notwendig, um Proben zu identifizieren und mit klinischen Daten zu verknüpfen. Idealerweise sollten Barcodes verwendet werden, um die Identifizierung

der Proben zu erleichtern sowie die Verblindung der Analyse und den Datenschutz des Patienten zu gewährleisten. Jedes Zentrum sollte einen eigenen Code verwenden, um die Proben mit klinischen und bildgebenden Daten retrospektiv verknüpfen zu können. Die Beschriftungen müssen wasser- und gefrierfest sein und eine Temperatur von -80°C tolerieren.

Punkt 16: Gefriertemperatur von -80°C

Die meisten großen Proteine wie Antikörper sind bei -20°C für mehrere Monate stabil [23]. Kleine Moleküle hingegen sind nicht beständig. Es gibt nur wenige publizierte Daten über die Auswirkungen von Einlagerungstemperaturen auf Liquorbestandteile. Eine Studie untersuchte die Auswirkung der Einlagerung von Liquor bei -20°C und -80°C auf Cystatin C, ein reichlich vorkommendes Liquorprotein. In allen Proben, die bei -20°C eingelagert wurden, kam es zur Spaltung des Proteins, während diese in Proben, die bei -80°C eingelagert wurden, ausblieb [24]. Abgesehen von der Verkürzung von Cystatin C, erschienen andere Veränderungen aufgrund der Probeneinlagerung bei -20°C für 3 Monate minimal [9, 10]. Oligoklonale Banden im Liquor können nach mehreren Jahren der Einlagerung bei -20°C wieder nachgewiesen werden, was die hohe Stabilität von Immunglobulinen widerspiegelt [25]. Allerdings liegen bis jetzt keine Studien vor, die speziell diese Problematik untersucht haben. Es gibt auch keine Daten, die Vorteile zeigen, Liquor oder Serum in flüssigem Stickstoff zu lagern. Da eine Einlagerung in flüssigem Stickstoff kostspielig und nicht praktikabel für Liquor-Biobanking ist, gibt es keinen Grund eine Einlagerung in flüssigem Stickstoff zu empfehlen. Wir empfehlen, Proben so bald wie möglich bei -80°C einzufrieren, um die Langzeitstabilität von Biomarkern zu sichern.

Zusätzliche Punkte zu Probensammelprotokollen, die in der Biomarker-Forschung von MS dokumentiert werden müssen (Tabelle 2, unten)

Punkt 17: Lokalisation der Proben

Der Aufbewahrungsort der Proben sollte idealerweise in einer Datenbank dokumentiert werden, die mit anderen klinischen Daten verknüpft werden kann, um das Wiederfinden dieser Proben zu erleichtern. Um einfaches Auffinden und schnelle Umlagerung von Proben zu ermöglichen, sollte die Information über die Einlagerung folgendes enthalten: Standort des Gefrierschranks, Identifizierung des Gefrierschranks und der Box, Probenlokalisierung innerhalb der Box, etc.

Punkt 18 und 19: Überwachung der Gefrierschränke und Aufteilung von Proben

Die Gefrierschränke sollten mit einer Alarmanlage überwacht werden und ein Probenrettungsplan sollte etabliert und dokumentiert sein. Alle Gefrierschränke müssen in einer Protokolldatei registriert sein. Idealerweise sollten die Tempe-

raturen von allen Gefrierschränken täglich dokumentiert werden. Aliquots von Proben sollten auf verschiedene Gefrierschränke aufgeteilt sein. Idealerweise sollte ein leerer Back-up-Gefrierschrank zur Verfügung stehen.

Notwendige Informationen in Datenbanken im Zusammenhang mit MS (Tabelle 3)

Punkt 20 und 21: Basis-demographische Daten wie Alter und Geschlecht

Die Information über das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme wird für die Vergleichbarkeit von alterskorrelierten Referenzintervallen benötigt, denn viele Proteine zeigen altersabhängige Veränderungen, z.B. Albumin, Albuminquotient oder IgG [26]. Idealerweise sind Geburtsdatum und Datum der Probenentnahme zu dokumentieren. Das Geschlecht muss aufgrund der Variabilität von mehreren durch Hormone beeinflussten Markern dokumentiert werden.

Punkt 22: Ethnizität

Referenzintervalle von Biomarkern können durch den genetischen Status beeinflusst werden und sich folglich zwischen ethnischen Gruppen unterscheiden [27]. Eine aktuelle Studie beobachtete beispielsweise einen höheren IgG-Index bei Afroamerikanern als bei Europiden, welcher nicht mit dem sozioökonomischen Status assoziiert war [28]. Kriterien für Rasse und Ethnizität sind auf der Webseite der National Institutes of Health verfügbar [29].

Standardisierung von Outcome-Messungen bei MS

Punkt 23–26: Klinischer Subtyp, Datum von Erstmanifestation und Diagnose zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Ein Ziel der Biomarkerforschung ist die Identifikation von Surrogatendpunkten für relevante Krankheitscharakteristika wie klinischem Subtyp, Krankheitsdauer, Krankheitsaktivität und -progression. Daher ist es wichtig, die Diagnose entsprechend den Standardkriterien zu stellen [30] und den korrekten Subtyp zum Zeitpunkt der Probenentnahme zu dokumentieren. Der Zeitpunkt des ersten und zweiten Schubes sollte auch aufgezeichnet werden, um den Zeitpunkt der Konversion von CIS zu klinisch definitiver MS zu dokumentieren [30].

Gewöhnlich werden folgende klinische Subtypen (Stadien) von MS unterschieden: klinisch isoliertes Syndrom (CIS), schubförmig remittierende MS (RRMS), schubförmig sekundär progrediente MS (SPMS), nicht schubförmige SPMS (NSPMS), primär progrediente MS (PPMS) und progredient schubförmige MS (PRMS) [31]. Im Fall von SPMS könnte der Zeitpunkt der Konversion zu SPMS hilfreich sein, um zwischen langsam und rasch progressiver MS zu unterschei-

den, oder Biomarker zu entwickeln, welche die Konversion zu der SPMS-Phase vorhersagen.

Punkt 27: Expanded Disability Status Scale (EDSS) und funktionelle Scores zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Wir empfehlen, geeignete und validierte Outcome-Messungen zu verwenden. Obwohl EDSS und funktionelle Scores nichtlineare Scores für den Schweregrad der Erkrankung sind und nicht notwendigerweise die Krankheitsprogression, die inflammatorische Aktivität und die Zahl der Läsionen widerspiegeln [32], sind sie ein wichtiges Maß der Behinderung und für Stratifizierung von Bedeutung. Es ist jedoch ratsam, auch andere klinische Skalen einzubeziehen, wie z.B. den MS functional composite (MSFC) und dessen Subscores [33]. Der MSFC berücksichtigt auch kognitive Funktionen, die bei 30 bis 70% der MS-Patienten beeinträchtigt sind [34].

Punkt 28: Klinische Scores zum Zeitpunkt der Follow-ups

Patienten sollten engmaschig nachuntersucht werden. Verlaufs-EDSS, die funktionellen Sub-Scores, MSFC und dessen Subscores sind hilfreich, um die Krankheitsprogression festzustellen, die einen wichtigen klinischen Endpunkt für die Evaluation von potentiellen Biomarkern darstellt.

Punkt 29: Anzahl der Schübe im Jahr vor der Probenentnahme und Zeitraum zwischen letztem Schub und Lumbalpunktion

Die Anzahl der Schübe sind retrospektive Indikatoren für klinische Aktivität, die den Status von Biomarkern zum Zeitpunkt der Probenentnahme beeinflussen kann. Aufgrund des physiologischen Umsatzes von Biomarkern aus dem Liquor muss das Zeitintervall zwischen Beginn des letzten Schubes und der Lumbalpunktion dokumentiert werden. Hat ein Patient zum Zeitpunkt der Probenentnahme einen Schub, sollte das auch vermerkt werden. Schübe sollten entsprechend den Schumacherkriterien definiert und der Zeitpunkt sollte, wenn möglich, dokumentiert werden [35]. Es ist wichtig, die Anzahl der Schübe in einem definierten retrospektiven Zeitfenster zu erfassen, vorzugsweise zwei Jahre, um vergleichbare und verlässliche Daten der jährlichen Schubrate zu erhalten.

Punkt 30: Anzahl der Schübe eines jeden Jahres im Follow-up

Da jährliche Schubraten oft verwendet werden, um die klinische Aktivität zu beschreiben und die meisten MS-Therapien vorwiegend die Zahl der Schübe beeinflussen, ist das eine wichtige Zielgröße in der Biomarkerforschung [36]. Idealerweise sollten die Zeitpunkte der Schübe dokumentiert werden, um einen Biomarker dahingehend untersuchen zu können, ob dieser baldige oder spätere Schübe vorhersagt.

Punkt 31 und 32: Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme sowie vor einem Jahr

Es ist bekannt, dass herkömmlich verwendete Medikamente in der Therapie der MS, einschließlich immunmodulatorische Substanzen und Methylprednisolon zur Therapie oder Prävention von Schüben, einen Einfluss auf die Expression von Biomarkern haben [37, 38]. Daher sollten Art und Dauer der Behandlung detailliert dokumentiert werden, vorzugsweise retrospektiv bis mindestens ein Jahr vor Liquorentnahme.

Punkt 33: Liquor-Basisanalyse

Um eine Stratifizierung der Patienten entsprechend ihrer Liquorbefunde zu ermöglichen und um die Eignung der Proben für weitere Analysen festzustellen, sollten die Ergebnisse der Liquor-Basisanalysen dokumentiert werden. Primär dient das Liquorprofil zum Ausschluss anderer Erkrankungen. Entzündliche Prozesse beeinflussen die Blut-Hirn-Schranke und damit die Konzentration von Biomarkern. Folgende Liquorbefunde sollten dokumentiert werden: Zellzahl, Differenzialzellbild, Erythrozytenzahl, oligoklonale IgG Banden, Liquor/Serum-Albumin-Ratio, Gesamtprotein (wenn Albumin nicht gemessen) und optional IgG-Index als ein wichtiges Maß für Entzündung. Oligoklonale Banden sind entscheidend, um den Wert von neuen diagnostischen Biomarkern zu bewerten. Die Sensitivität von oligoklonalen IgG-Banden ist stark von der verwendeten Methode abhängig und deshalb sollte diese dokumentiert werden. Wir empfehlen die isoelektrische Fokussierung gefolgt von Immunoblotting [39, 40]. Die Methoden aller diagnostischen Routineprozeduren sollten dokumentiert werden.

Punkt 34–35: MRT-Charakteristika des Gehirns, Anzahl der Läsionen und Läsionslast

Folgende Punkte sollten beinhaltet sein: Wurde ein MRT von Gehirn und/oder Rückenmark durchgeführt, sollte Datum und Ort der Untersuchung dokumentiert werden (um die Ursprungsdaten einsehen zu können). Der Datensatz sollte für spätere Analysen verfügbar sein (idealerweise in einer zentralisierten Datenbank). Es ist zwar fraglich, ob die Anzahl der Läsionen und die Läsionslast im Zuge diagnostischer Routineuntersuchungen verlässlich erfasst werden, aber es handelt sich um nützliche Parameter zur Einschätzung der Krankheitsaktivität. Es ist zu bedenken, dass große Abweichungen zwischen verschiedenen bildgebenden Zentren hinsichtlich verwendeter Routinesequenzen (axial vs. Sagittal, T2 vs. Protonengewichtung (PD) vs. FLAIR-Techniken, Schichtdicke, Durchmesser von Läsionen, etc.) existieren. Ein wertvoller und zuverlässiger Parameter ist die Anzahl der Gadolinium-anreichernden Läsionen, denn die Präsenz Gadolinium-anreichernder Läsionen spiegelt die entzündliche Aktivität zum Zeitpunkt des Scans und idealerweise auch die von Liquor- und Blutproben wider. Im Kontext von Studien über Biomarker für Neurodegeneration und Neuroprotektion bei MS könnten Informationen betreffend Gehirnatrophie wertvoll sein, auch wenn unterschied-

liche Outcome-Messungen von Atrophie in verschiedenen Zentren existieren. Wünschenswert wäre ein einheitliches MRT-Protokoll [41, 42].

Punkt 36: Longitudinale MRT-Scans

Longitudinale MRT-Scans wären grundsätzlich wünschenswert, um die Krankheitsprogression zu überwachen und in ausgewählten Zentren ist das möglich. Da aber keine standardisierten MRT Protokolle für Routine-Verlaufsuntersuchungen vorliegen, können zurzeit keine regulären Follow-up-MRTs empfohlen werden.

Punkt 37: Einheitliche Sprache für Daten in der Liquor-Datenbank

Die Maske der Datenbank kann in der jeweiligen Landessprache verfasst werden, aber die zugrunde liegenden Daten sollten in Englisch sein. Es ist naheliegend, ein kommerziell erhältliches Programm zu verwenden. Verwendete Einheiten sollten dem internationalen System folgen.

Ethische Aspekte

Für die Kooperation im Rahmen der Biomarkerforschung ist das Vorliegen von „Good Ethical Protocols“, die nationalen und internationalen ethischen und anderen rechtlichen Regularien entsprechen, unumgänglich. Die meisten, wenn nicht alle, Zentren haben bereits „Good Ethical Protocols“ für Liquor-Biobanking und Biomarkerforschung. Der wichtigste Punkt ist, dass die Protokolle den Austausch von Proben (codiert oder pseudo-anonymisiert) sowie von relevanten Patienteninformationen und Patienteneinwilligungen erlauben. Um dem Bedarf klinischer Forscher zu entsprechen, sollten die Proben initial pseudoanonymisiert werden, d.h. mit einem Code versehen, der die Identifikation des Patienten und somit eine Aktualisierung klinischer Details auch noch nach Entnahme und Einlagerung der Probe ermöglicht. Bei Entnahme aus der Biobank sollten die Proben dann anonymisiert sein. Das dient dem Datenschutz der Individuen, die sich für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt haben. Forscher sind verpflichtet, ihre zuständige Ethikkommission über neue Forschungsprojekte zu informieren und Übereinkommen für Probentransfers zu schließen. Ein exemplarisches Übereinkommen wurde kürzlich von BioMS-eu erarbeitet. Da sich Richtlinien in verschiedenen Zentren und Staaten unterscheiden, obliegt es der Verantwortung der Forschungszentren, ihre Prozeduren entsprechend lokaler Gegebenheiten zu adaptieren.

Schlussbemerkungen

Die Auflistung in Tabelle 2 kann als Checkliste für die Erstellung von Prozeduren im Rahmen von Liquor-Biobanking von neurodegenerativen Erkrankungen und auch als Checkliste für die Aufzeichnung von Probencharakteristika

verwendet werden. Tabelle 3 zeigt speziell eine Checkliste für Biobanking im Rahmen der Biomarkerforschung für MS.

Diese Standardisierungen sollen den Weg für große Biomarkerstudien und Kooperationen ebnen. Letztlich sollen diese Bemühungen zu validierten Biomarker-Assays für Diagnostik, Prognose und Therapie von Erkrankungen des ZNS führen und relevante Krankheitsmechanismen erklären.

Anhang: DNA: Lagerung und Umgang

DNA kann in Abhängigkeit von der Probenqualität, der Probenquantität und der benötigten Qualität von Geweben und Zellen gewonnen werden. Nach der Gewinnung sollten eine Quantifizierung und entsprechende Qualitätskontrolle durchgeführt werden. Das geschieht mittels photometrischer Quantifizierung bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm und der Analyse mit Gel-Elektrophorese. Alternative Methoden werden verwendet, um den Prozess zu vereinfachen und hohe Durchsatzraten zu gewährleisten. In jedem Fall sollte die verwendete Methode für jede Probe zusammen mit den Ergebnissen der Qualitäts- und Quantitätsbestimmung dokumentiert werden. DNA kann in gelöster oder in getrockneter Form gelagert werden, wobei gelöste DNA tiefgefroren und getrocknete DNA bei Raumtemperatur aufbewahrt werden sollte. Die Lagerungsbedingungen sollten wie die Lagerungsdauer dokumentiert werden. Nach längerer Lagerung empfiehlt sich eine neuerliche Qualitätskontrolle, bevor die DNA experimentell verwendet wird.

Danksagung

Wir danken den anderen Teilnehmern des BioMS-eu Meetings (London, März 2007) für ihren Beitrag zur Diskussion, die in der Formulierung dieser Richtlinien mündete: A. Berthele, A. Bertolotto, F. Gilli, E. Iacobaeus, N. Jafari, CR. Jimenez, J. Killestein, A. Kok, A. Kroksveen, V. Lampasona, R. Lindberg, A. Millonig, E. Havrdova, A. Sala, S. Suessmith, D. Sadovnik, H.L. Weiner, B. Wilson, R. Banks, Y. Ben-Schloma, D. Wright, J. Zajicek, H. Abderrahim, B. Gomez, B. Greco, E. Hauben, A. Jaber, A. Konieczny, M. Maurizio, T. Plitz, P. Zaratini, R. Sachse, A. Lockhart, P. Thompson, S. Al-Izki, D. Baker, J. Furby, R. Gani, S. Gnanapavan, T. Hayton, S. Jackson, R. Kapoor, C. Luk, H. Parkes, K. Schmierer, K. Smith, C. Maggiore, R. Farrell.

Literatur

1. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, et al. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol* 2006;13: 913–22.
2. Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 2004;127:1463–78.
3. Teunissen CE, Dijkstra C, Polman C. Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2005;4:32–41.

4. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006;44:750–9.
5. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001;310:173–86.
6. Grant R, Condon B, Hart I, Teasdale GM. Changes in intracranial CSF volume after lumbar puncture and their relationship to post-LP headache. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:440–2.
7. Kuntz KM, Kokmen E, Stevens JC, Miller P, Offord KP, Ho MM. Post-lumbar puncture headaches: experience in 501 consecutive procedures. *Neurology* 1992;42:1884–7.
8. Petzold A, Sharpe LT, Keir G. Spectrophotometry for cerebrospinal fluid pigment analysis. *Neurocrit Care* 2006;4:153–62.
9. Berven FS, Kroksveen AC, Berle M, Rajalahti T, Flikka K, Arneberg R, et al. Pre-analytical influence on the low molecular weight cerebrospinal fluid proteome. *Proteomics – Clinical Applications* 2007;1:699–711.
10. Jimenez CR, Koel-Simmelink MJR, Pham T, Voort van der L, Teunissen CE. Endogeneous peptide profiling of cerebrospinal fluid by MALDI-TOF mass spectrometry. *Proteomics Clinical Applications* 2007;1:1385–92.
11. Peskind ER, Riekse R, Quinn JF, Kaye J, Clark CM, Farlow MR, et al. Safety and acceptability of the research lumbar puncture. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2005;19:220–5.
12. Carson D, Serpell M. Choosing the best needle for diagnostic lumbar puncture. *Neurology* 1996;47:33–7.
13. Lewczuk P, Beck G, Esselmann H, Bruckmoser R, Zimmermann R, Fiszer M, et al. Effect of sample collection tubes on cerebrospinal fluid concentrations of tau proteins and amyloid beta peptides. *Clin Chem* 2006;52:332–4.
14. Murillo-Rodriguez E, Desarnaud F, Prospero-Garcia O. Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci* 2006;79:30–7.
15. Jimenez CR, Piersma S, Pham TV. High-throughput and targeted in-depth mass spectrometry-based approaches for biofluid profiling and biomarker discovery. *Biomarkers in Medicine* 2007;1:541–65.
16. Scharbert G, Kalb M, Marschalek C, Kozek-Langenecker SA. The effects of test temperature and storage temperature on platelet aggregation: a whole blood in vitro study. *Anesth Analg* 2006;102:1280–4.
17. Lomholt AF, Frederiksen CB, Christensen IJ, Brunner N, Nielsen HJ. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as a biological marker? Pre-analytical considerations. *Clin Chim Acta* 2007;380:128–32.
18. Kenis G, Teunissen C, De JR, Bosmans E, Steinbusch H, Maes M. Stability of interleukin 6, soluble interleukin 6 receptor, interleukin 10 and CC16 in human serum. *Cytokine* 2002;19:228–35.
19. Bibl M, Esselmann H, Otto M, Lewczuk P, Cepek L, R  ther E, et al. Cerebrospinal fluid amyloid beta peptide patterns in Alzheimer's disease patients and nondemented controls depend on sample pretreatment: indication of carrier-mediated epitope masking of amyloid beta peptides. *Electrophoresis* 2004;25:2912–8.
20. Schoonenboom NS, Mulder C, Vanderstichele H, Van Elk EJ, Kok A, Van Kamp SJ, et al. Effects of processing and storage conditions on amyloid beta (1–42) and tau concentrations in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice. *Clin Chem* 2005;51:189–95.
21. Aziz N, Nishanian P, Mitsuyasu R, Detels R, Fahey JL. Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:89–95.
22. Tuck MK, Chan DW, Chia D, Godwin AK, Grizzle WE, Krueger KE, et al. Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *J Proteome Res* 2009;8:113–7.
23. Widl K, Brettschneider J, Schattauer D, St  ssmuth S, Huber R, Ludolph AC, et al. Erythropoietin in cerebrospinal fluid: age-related reference values and relevance in neurological disease. *Neurochem Res* 2007;32:1163–8.
24. Carrette O, Burkhard PR, Hughes S, Hochstrasser DF, Sanchez JC. Truncated cystatin C in cerebrospinal fluid: technical [corrected] artefact or biological process? *Proteomics* 2005;5:3060–5.
25. Triendl A. The clinical significance of monoclonal and biclonal bands in cerebrospinal fluid isoelectric focusing. http://aleph.uibk.ac.at/ALEPH/-/F?func=find-b&request=AC03081400&find_code=WID 2000.
26. Garton MJ, Keir G, Lakshmi MV, Thompson EJ. Age-related changes in cerebrospinal fluid protein concentrations. *J Neurol Sci* 1991;104:74–80.
27. Moulds JM. Ethnic diversity of class III genes in autoimmune disease. *Front Biosci* 2001;6:D986–91.
28. Rinker JR, Trinkaus K, Naismith RT, Cross AH. Higher IgG index found in African Americans versus Caucasians with multiple sclerosis. *Neurology* 2007;69:68–72.
29. Race and ethnicity criteria NIH. Ref type: internet communication, 2009.
30. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the ‘‘McDonald Criteria’’. *Ann Neurol* 2005;58:840–6.
31. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of new agents in multiple sclerosis. *Neurology* 1996;46:907–11.
32. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, et al. Multiple sclerosis severity score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005;64:1144–51.
33. Cutter GR, Baier ML, Rudick RA, Cookfair DL, Fischer JS, Petkau J, et al. Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. *Brain* 1999;122 (Pt 5):871–82.
34. Bobholz JA, Rao SM. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: a review of recent developments. *Curr Opin Neurol* 2003;16:283–8.
35. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis; report by the panel on evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1965;122:552–68.
36. Rio J, Nos C, Tintore M, Tellez N, Galan I, Pelayo R, et al. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2006;59:344–52.
37. Frequin ST, Barkhof F, Lamers KJ, Hommes OR, Borm GF. CSF myelin basic protein, IgG and IgM levels in 101 MS patients before and after treatment with high-dose intravenous methylprednisolone. *Acta Neurol Scand* 1992;86:291–7.
38. Rieckmann P, Altenhofen B, Riegel A, Kallmann B, Felgen-

- hauer K. Correlation of soluble adhesion molecules in blood and cerebrospinal fluid with magnetic resonance imaging activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998;4: 178–82.
39. Andersson M, varez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897–902.
40. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 2005;62:865–70.
41. Jasperse B, Valsasina P, Neacsu V, Knol DL, De Stefano N, Enzinger C, et al. Intercenter agreement of brain atrophy measurement in multiple sclerosis patients using manually-edited SIENA and SIENAX. *J Magn Reson Imaging* 2007;26:881–5.
42. Swanton JK, Rovira A, Tintore M, Altmann DR, Barkhof F, Filippi M, et al. MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurol* 2007;6:677–86.